

【小鼠大学问】诱导型Cre，给基因敲除装个“开关”

基因敲除的时间控制。诱导型 Cre-loxP 系统介导了时间特异性基因敲除。通过对给予诱导剂的时间的控制，人为操控基因敲除的发生。

诱导型Cre有哪几种类型？

• 启动子激活型

通过诱导剂来调节驱动 Cre 重组酶的启动子活性。例如：四环素诱导型、干扰素诱导型

• 配体诱导型

通过将 Cre 重组酶与激素受体的配体结合域（ligand-binding domain, LBD）相融合，形成定位于胞浆的融合蛋白，只有在激素诱导后，融合的 Cre 蛋白才会通过构象变化从锚定蛋白 HSP90 上解离下来，进入细胞核，识别 loxP 位点并发生重组。例如：雌激素诱导型

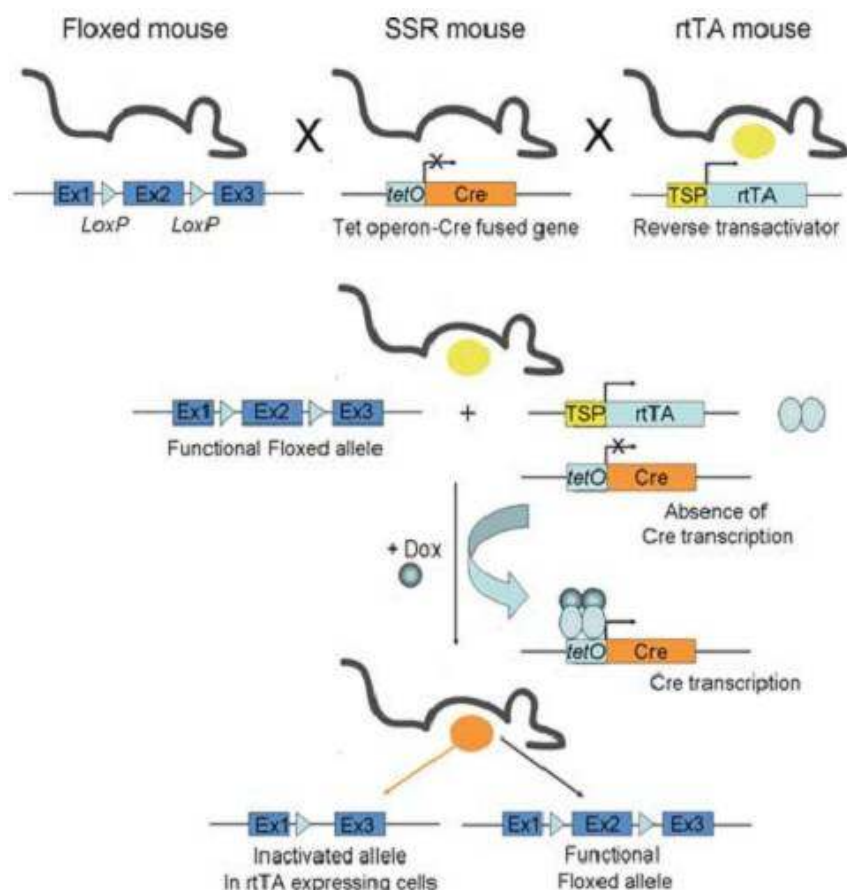
四环素诱导型 tetO-Cre

将四环素调控系统与 Cre-loxP 系统相结合，一般需要两种转基因小鼠交配使用：

- 一种是由四环素响应启动子元件（TRE，也叫 **tetO**）控制的 Cre 工具鼠（TRE-Cre，也叫 tetO-Cre）。
- 另一种是由组织特异性启动子驱动的表达四环素转录活化因子 **rtTA** 或 **tTA** 的小鼠。

tetO 本身缺乏启动子活性，无法独立驱动下游基因的表达。只有当具有转录激活功能的 rtTA 或者 tTA 与 tetO 结合后才能激活 Cre 的表达。rtTA 或 tTA 与 tetO 的结合受四环素或四环素衍生物强力霉素（Dox）的调节。tTA 在没有 Dox 的时候与 tetO 结合诱导 Cre 表达，有 Dox 的时候不能与 tetO 结合，Cre 不表达；rtTA 与 tTA 相反，有 Dox 的时候与 tetO 结合，诱导 Cre 表达，没有 Dox 的时候与 tetO 不结合，Cre 不表达。因此，在 tetO-Cre 与组织特异性 rtTA（或 tTA）**双转基因阳性**小鼠中，可以通过给予或撤离 Dox 来控制 Cre 重组酶在特定组织中产生的时间。

看起来有点复杂有木有？希望下面这张示意图能帮你理解 tetO-Cre 在 CKO 中的应用。



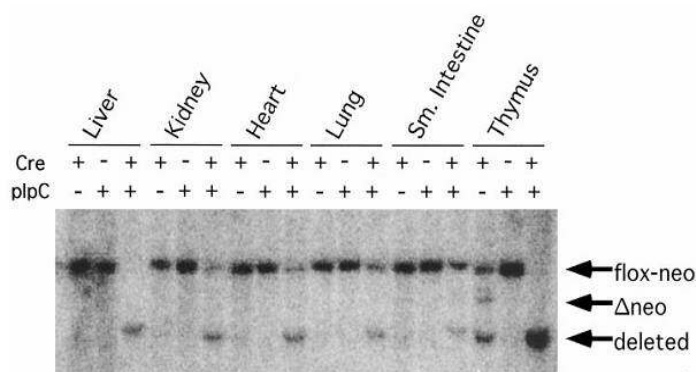
tetO-Cre 与 rtTA 小鼠联用，在给予 Dox 的情况下敲除目的基因。图片来自《Transgenesis Techniques Principles and Protocols 》Third Edition

所以，利用四环素诱导条件性基因敲除需要3种基因工程小鼠同时使用，相互交配才能最终获得 flox 纯合且 Cre 与 rtTA（或 tTA）双阳性的子代小鼠。整个系统较为复杂，繁育及基因型鉴定工作量都比较大。

干扰素诱导型 Mx1-Cre

干扰素诱导是通过 Mx1 基因启动子对于干扰素的响应来实现的。Mx1-Cre 小鼠在一般状态下不表达 Cre 重组酶，但可以通过干扰素- α 、干扰素- β 或人工合成的双链 RNA 类似物 poly I:C 的处理而诱导表达 Cre。

利用 Mx1-Cre 虽然可用于在发育过程中的任意时间点诱导目的基因敲除小鼠，但仅限于在响应干扰素的细胞中。目的基因敲除的效率也依赖于组织或细胞对干扰素的响应水平或干扰素响应细胞的数量。



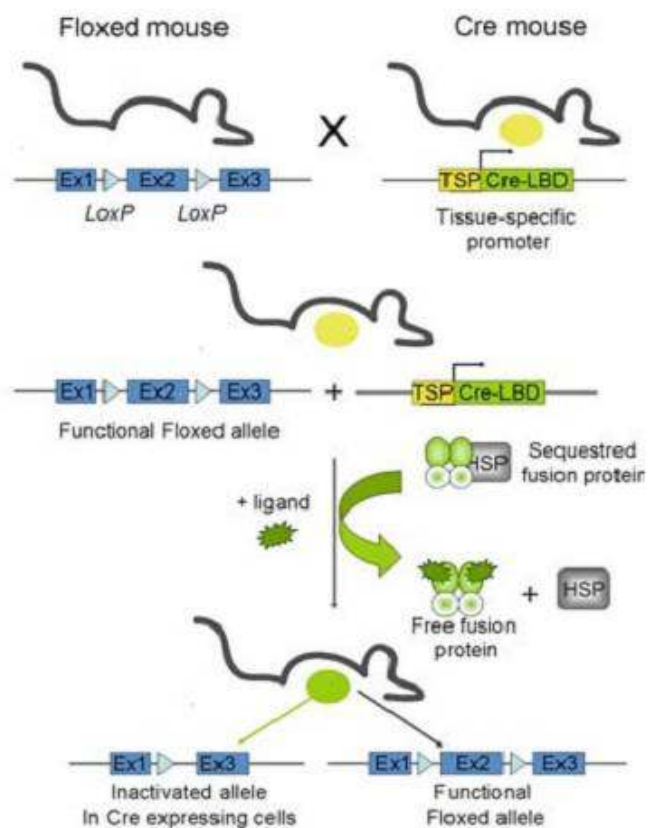
Detection of the Extent of Cre-Mediated Recombination in Different Tissues of plpC-Treated Arnt-Floxed/Mx1-Cre Mice. 图片来自 Mol Endocrinol. 2000 Oct;14(10):1674-81.

雌激素诱导型 Cre-ER

将雌激素受体 (estrogen receptor, 简称ER) 的配体结合区与 Cre 重组酶相融合, 形成定位于胞浆中的融合蛋白 (Cre-ER)。这样就通过控制雌激素的注射时间, 可以实现对基因重组时间特异性的调控。

可是机体自身不是就有雌激素分泌吗? 为了避免内源雌激素的干扰, 在人ER的配体结合区做一个点突变 (G521R) 就可以使 Cre-ER 只响应外源的人工合成雌激素 (比如: Tamoxifen、4-OHT) 的诱导, 命名为 **Cre-ERT**。之后, 另一种 LBD 突变体融合蛋白被证明对 4-OHT 具有远高于 Cre-ERT 的敏感性, 这种突变体就是大名鼎鼎的 **Cre-ERT2** 啦。它带有人 ER LBD 中的3个点突变: C400V/M543A/L544A。

Cre-ER 系统, 特别是 Cre-ERT2, 是目前应用最广泛的诱导型 Cre 系统。其较之四环素诱导型 Cre, 系统更为简单。我们只需要将 Cre-ERT2 设计在组织特异性启动子之后, 并与 flox 小鼠交配, 就可以通过在特定时间点给予 **Tamoxifen** 来最终实现对靶基因的时空特异性敲除啦。



图片来自《Transgenesis Techniques Principles and Protocols 》Third Edition

[点击查看更多工具鼠成品模型](#)